

FR 00/613
EJU

REC'D	03 APR 2000
WIPO	PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **09 MARS 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES 15 mars 99		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 99 03159		CABINET ORES	
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75		6 Avenue de Messine	
DATE DE DÉPÔT 15 MARS 1999		75008 PARIS	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle		n° du pouvoir permanent : références du correspondant CMGBLOm644/41FR	
<input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire		<input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°	
<input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°	
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat		date	
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
Titre de l'invention (200 caractères maximum)			
UTILISATION DE LA PROTEINE Grb14 ET DES PROTEINES ADAPTATRICES HOMOLOGUES COMME OUTIL DE CRIBLAGE DE MOLECULES DESTINEES AU TRAITEMENT DES MALADIES LIEES A L'INSULINE			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN		code APE-NAF	
Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination		Forme juridique	
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS		Etablissement public	
Nationalité (s) française		Pays	
Adresse (s) complète (s)		FRANCE	
3 rue Michel Ange			
75794 PARIS Cédex 16			
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE			
pays d'origine		numéro	
date de dépôt		nature de la demande	
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°		date n°	
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION	
Béatrice ORES (92-4046)			

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg

75800 Paris Cédex 08

CMGBLOrm644/41FR

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 03 159

TITRE DE L'INVENTION :

UTILISATION DE LA PROTEINE Grb14 ET DES PROTEINES ADAPTATRICES HOMOLOGUES
COMME OUTIL DE CRIBLAGE DE MOLECULES DESTINEES AU TRAITEMENT DES MALADIES
LIEES A L'INSULINE

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6 Avenue de Messine

75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BURNOL Anne-Françoise, 52 Grande Rue, 92310 SEVRES

PERDEREAU Dominique, 16 rue Henri Tariel, 92130 ISSY-LES MOULINEAUX

KASUS-JACOBI Anne, 5 place Louis Durey, 78180 MONTIGNY LE BRETONNEUX

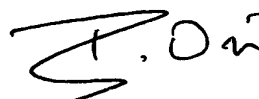
BEREZIAT Véronique, 24 rue du Hameau des Joncherettes, 91120 PALAISEAU

GIRARD Jean, 54 rue Vergniaud, 75013 PARIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 15 mars 1999



Béatrice ORES (92-4046)

La présente invention se rapporte à l'utilisation de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues, comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies liées à l'insuline.

L'insuline, hormone principale de la régulation du métabolisme énergétique est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme ; elle stimule le transport du glucose et son utilisation par les tissus périphériques (muscles squelettiques et tissu adipeux) et inhibe la production endogène de glucose par le foie.

L'insuline agit par l'intermédiaire d'un récepteur qui est exprimé à la membrane plasmique des cellules. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, qui sont caractérisés par la présence d'un domaine intracellulaire portant l'activité catalytique. La liaison du ligand induit la dimérisation des récepteurs, l'activation du domaine tyrosine kinase, et la phosphorylation (autophosphorylation et transphosphorylation) de résidus tyrosines spécifiques présents dans la partie cytosolique des récepteurs (Ullrich, A. et al. (1990) *Cell*, 61, 203-212).

Le récepteur de l'insuline possède la particularité d'être présent sous une forme naturellement dimérisée. La liaison de l'insuline à la sous-unité α extracellulaire induit des modifications conformationnelles qui aboutissent à l'activation du domaine kinase porté par la sous-unité β du récepteur, et à son autophosphorylation, nécessaire à l'activation complète du récepteur. Le récepteur de l'insuline ainsi activé phosphoryle des protéines intracellulaires qui servent d'effecteurs du signal de l'insuline (figure 1).

Parmi les différents relais entre le récepteur de l'insuline et ses effecteurs intracellulaires, les protéines les mieux caractérisées sont IRS-1, IRS-2 (*Insulin Receptor substrate-1 and 2*) et Shc (*Src and collagen homologous protein*) (White M.F. et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 1-4 ; Waters S.B. et al. (1996) *Trends Cell Biol.*, 6, 1-4). Ces protéines sont appelées protéines adaptatrices. Elles ne sont pas spécifiques des tissus sensibles à l'insuline et sont également phosphorylées aussi bien après l'activation d'autres récepteurs à tyrosine kinase qu'après celle de récepteurs de cytokines ou de récepteurs couplés à la protéine G (Bonfini L. et al. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, 21, 257-261 ; Souza S.C. et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 30085-30088 ; Argetsinger L.S. et al. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 14685-14692 ; Plataniias L.C. et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 278-282 ; Velloso L.A. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12490-12495 ; Kowalski-Chauvel A. et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 26536-26361).

Récemment de nouvelles protéines adaptatrices susceptibles d'être impliquées spécifiquement dans la transduction du signal de l'insuline ont été clonées par interaction avec le récepteur de l'insuline en utilisant le système double-hybride, en particulier différentes isoformes de la protéine Grb10 de l'homme et de la souris (Liu F. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10287-10291 ; O'Neill T. J. et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 22506-22513 ; Frantz J.D. et al. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 2659-2667) et la protéine hGrb14 chez l'homme (Daly R.J. et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 12502-12510).

Plus récemment encore les Inventeurs ont cloné chez le rat, par interaction avec le récepteur de l'insuline en utilisant le système double-hybride, la protéine rGrb14 (Kasus-jacobi et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 26026-26035).

Les protéines hGrb10, hGrb14 et rGrb14 appartiennent à la même famille de protéines adaptatrices dont le premier membre connu est la protéine Grb7 qui se lie au récepteur de l'EGF, du Ret et du PDGF (Margolis B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8894-8898).

Ces protéines qui ont été clonées par interaction avec des récepteurs activés de l'insuline, semblent jouer un rôle important dans la transduction du signal de l'insuline.

Ainsi les Inventeurs ont montré que l'expression de la protéine rGrb14 est très bien corrélée avec la sensibilité des tissus à l'insuline et que sa surexpression dans des cellules CHO-IR (*Chinese Hamster Ovary* exprimant des taux élevés de récepteurs de l'insuline d'origine humaine) inhibe les effets de l'insuline en diminuant l'activation de IRS-1 sans modifier l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline. (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité).

Les protéines adaptatrices de la famille de Grb7 sont caractérisées par la succession de trois domaines (figure 2) :

- une séquence riche en proline appelée PP, près de l'extrémité amino-terminale,
- un domaine central appelé PH (*Pleckstrin homology*) et
- un domaine appelé SH2 (*Src homology 2*) à l'extrémité carboxy-terminale, connu pour interagir avec les séquences contenant des phosphotyrosines (Ooi J. et al. (1995) *Oncogene*, 10, 1621-1630 ; Margolis B. (1992) déjà cité ; Daly R.J. (1996) déjà cité).

Outre ces domaines qui ont été déjà bien étudiés chez d'autres protéines, les Inventeurs ont mis en évidence sur la protéine rGrb14, un nouveau

domaine appelé PIR (*Phosphorylated Insulin Receptor Interacting Region*) ; par comparaison entre les protéines Grb7, Grb10 et Grb14, les Inventeurs ont montré qu'une séquence de 43 acides aminés correspondant aux acides 365 à 407 de la protéine rGrb14 est hautement conservée dans l'ensemble de la famille de ces protéines (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité) et devrait jouer un rôle particulier dans la fixation de ces protéines sur le récepteur de l'insuline (figure 2 et figure 3).

Un autre domaine appelé BPS (*Between PH and SH2*) a été également récemment mis en évidence sur la protéine hGrb10 (He W. et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 6860-6867) ; ce domaine semble être un domaine homologue de PIR (Kasus-Jacobi et al. (1998) déjà cité) et correspond aux acides aminés 358-454 de la protéine hGrb10 (figure 4).

Plusieurs équipes ont montré qu'il y avait des défauts de phosphorylation du récepteur de l'insuline ainsi que des altérations des effets de l'insuline sur le transport de glucose et sur l'activation de certaines enzymes chez des patients obèses ou diabétiques (Arner, P. et al., J. N. (1987), *Diabetologia*, 30, 437-440 ; Caro, J. F. et al. (1987), *J. Clin. Invest.*, 79, 1330-1337 ; Mandarino, L. J. (1989), *Diab. Metab. Rev.*, 5, 475-486).

Des mutations du gène du récepteur de l'insuline peuvent conduire par différents mécanismes à une diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur, contribuant ainsi au développement d'un état de résistance à l'insuline et à l'instauration de pathologies comme l'obésité et le diabète non-insulino-dépendant (DNID) (Taylor, S. I. (1992), *Diabetes*, 41, 1473-1490).

Dans des états de résistance à l'insuline, il y a développement d'une hyperglycémie lorsque la sécrétion endogène d'insuline n'est plus suffisante, et il faut faire appel à une insulinothérapie pour maintenir l'homéostasie glucidique. Après 10 ans d'évolution du diabète, on observe dans 30% des cas des complications sévères. Ces complications, secondaires à un mauvais contrôle de la glycémie, ont de très sérieuses implications cliniques (insuffisances rénales, nécrose et amputation des membres inférieurs, cécité) qui conduisent à un raccourcissement de l'espérance de vie des patients.

La normalisation de l'activité tyrosine kinase lorsqu'elle est perturbée peut être envisagée soit directement en utilisant des molécules qui agissent sur cette enzyme (Levitzki et al. (1995), *Science* 267, 1782-1788), soit indirectement en inhibant les interactions entre les protéines adaptatrices et la tyrosine kinase (Pendergast et al. (1993), *Cell*, 75, 175-185).

Or les Inventeurs ont montré de manière surprenante que la liaison de la protéine rGrb14 et de la protéine hGrb10 inhibent l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, alors que la protéine Grb7 est pratiquement sans effet (figure 6). Les protéines Grb14 et Grb10 utilisées dans cet essai sont produites en fusion avec la GST (Glutathione-S-transferase) puis purifiées.

Grb14 et Grb10 se comportent donc comme des inhibiteurs endogènes de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, ce qui est une fonction tout à fait nouvelle pour un adaptateur moléculaire. En effet, la transduction d'un signal à l'intérieur de la cellule après la stimulation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, fait appel à des cascades d'interactions protéine-protéine dans lesquelles les adaptateurs moléculaires ont un rôle privilégié. Par l'intermédiaire de leurs domaines d'interactions protéiques, les adaptateurs permettent le recrutement des effecteurs successifs, constituant les voies de signalisation. C'est ainsi par exemple, que l'adaptateur Grb2 est recruté par l'intermédiaire de son domaine SH2 au niveau de résidus phosphotyrosine de RTK activés et autophosphorylés, et se lie par un domaine SH3 sur l'échangeur nucléotidique Sos, qui lui même va permettre l'activation de Ras (Schlessinger, J. (1993), *Trends Bioch. Sci.*, 18, 273-275).

L'effet inhibiteur de la protéine rGrb14 est reproduit par les protéines de fusion GST-PIR et GST-PIR+SH2 purifiées, obtenues par fusion de la GST avec le domaine PIR ou le domaine PIR+SH2 de rGrb14 (figure 7). En revanche cet effet inhibiteur n'est pas observé avec la protéine de fusion GST-SH2 obtenue par fusion GST avec le domaine SH2 de rGrb14 (figure 7).

Le domaine PIR+SH2 a un effet inhibiteur plus important que le PIR exprimé seul. En effet l'inhibition totale de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est obtenue lorsque l'on ajoute 0,3 µg de protéine GST-PIR, alors qu'il ne faut que 0,03 µg de GST-PIR+SH2 (figure 7). Il semble donc que si le domaine SH2 n'a pas d'activité inhibitrice propre, par contre il potentialise fortement l'effet du PIR.

De façon comparable, les domaines PIR et PIR+SH2 de Grb10 ont un effet inhibiteur sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline (figure 8). Le domaine SH2 de Grb10 n'a pas en lui même d'effet inhibiteur, mais il potentialise également l'inhibition induite par le PIR.

Ainsi la protéine Grb14 et les protéines adaptatrices homologues pourraient être des cibles potentielles pour des médicaments.

En effet des composés qui seraient susceptibles d'augmenter ou de supprimer les interactions de ces protéines pourraient prévenir ou guérir les troubles

de l'organisme liés à une modification de l'activité de la protéine kinase.

Au sens de la présente invention, les protéines homologues sont des protéines comprenant une séquence présentant une identité d'au moins 45 % avec le domaine PIR ou avec le domaine BPS.

5 En conséquence, les Inventeurs se sont donnés pour but de mettre au point un procédé de criblage de molécules destinées au traitement des maladies liées à l'insuline.

La présente invention a pour objet l'utilisation de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues comme outil de criblage de molécules destinées
10 au traitement des maladies liées à l'insuline.

La présente invention a notamment pour objet l'utilisation de protéines contenant une séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences : SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 (figure 4), et SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 (figure 5), comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies
15 liées à l'insuline.

La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation des protéines rGrb14, hGrb14, hGrb10 et mGrb10 comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies liées à l'insuline.

La présente invention se rapporte également à un procédé de détection
20 de molécules aptes à stimuler ou inhiber les interactions de la protéine adaptatrice Grb14, des protéines adaptatrices homologues, avec le récepteur de l'insuline, lequel procédé comprend :

- la mise en contact de la molécule à tester avec ladite protéine dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre cette molécule et ladite protéine' et
- 25 ■ la détection du complexe éventuellement formé.

Les composés ainsi sélectionnés seraient potentiellement utiles pour prévenir ou traiter des maladies liées à l'insuline comme par exemple le diabète et l'obésité ou d'autres pathologies caractérisées par une résistance à l'insuline telles que l'ovaire polycystique (Legro, R. S. et al. (1998), *Rec. Progr. Hormone Res.*, 53, 217-255) ou le syndrome X (Komers, R. et al. (1998), *Physiol. Res.*, 47, 215-225).
30

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples, notamment en rapport avec les figures et tableaux dans lesquels :

- la figure 1 représente une schématisation des grandes voies de
35 signalisation de l'insuline actuellement connues. La liaison de l'insuline sur les sous-

unités α extracellulaires du récepteur permet l'activation de la tyrosine kinase portée par la sous-unité β intracellulaire. Après autophosphorylation et complète activation du récepteur, des substrats intracellulaires tels que les protéines IRS et Shc se lient par l'intermédiaire de leur domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) sur le récepteur, et sont phosphorylés sur des résidus tyrosines. IRS et Shc servent alors d'ancrage pour des protéines contenant des domaines SH2, et sont à l'origine des deux grandes voies de signalisation actuellement décrites (voies des MAP Kinases et de la Phosphatidylinositol 3-kinase).

- la figure 2 illustre le mécanisme d'activation de la tyrosine kinase du récepteur de l'insuline: (1) en l'absence d'insuline la tyrosine kinase du récepteur est inactive: le site de liaison pour l'ATP et le Mg^{2+} est masqué à l'intérieur de la molécule, essentiellement par le résidu asparagine 1138, et de plus le site catalytique est occupé par la tyrosine 1150 de la boucle régulatrice ce qui prévient toute interaction avec d'autres substrats cytosoliques (Hubbard, S. R. e al. (1994), *Nature* 372, 746-754) ; (2) la liaison de l'insuline entraîne un changement de conformation et une meilleure accessibilité du site de liaison de l'ATP et du Mg^{2+} ; (3) les tyrosines 1150, puis 1146 et enfin 1151 de la boucle régulatrice pourront alors être phosphorylées, aboutissant à l'ouverture maximale de la molécule qui permet l'accessibilité des substrats au site catalytique (Hubbard, S. R. (1997) *EMBO J.*, 16, 5572-5581).

- la figure 3 illustre l'alignement des protéines de la famille des protéines Grbs. Les pourcentages d'identité en acides aminés des domaines sont exprimés par rapport au domaine homologue de rGrb14 PP : motif riche en résidus proline, site de liaison de protéines contenant des domaines SH3 ; PH : domaine d'homologie avec la plexstrine, association avec des phospholipides ou des protéines ; PIR, *phosphorylated insulin receptor interacting region* ; SH2, domaine permettant une interaction avec des résidus phosphotyrosines.

- la figure 4 illustre l'alignement des domaines PIR des protéines de la famille des protéines Grbs. Les acides aminés conservés sont indiqués par un astérisque. Le domaine médian particulièrement bien conservé est grisé.

- la figure 5 illustre en haut : l'alignement des domaines BPS des protéines de la famille des Grbs. Les pourcentages d'identité en acides aminés des domaines sont exprimés par rapport au domaine homologue hGrb10 ; en bas : 6 protéines hybrides de Grb10.

- la figure 6 illustre l'effet des protéines Grbs sur l'activité tyrosine

kinase des récepteurs de l'insuline; (O) GST-rGrb14 ; () GST-mGrb10 ;
(□) GST-rGrb7

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue en l'absence de protéine ajoutée. Nombre d'expériences = 2

- 5 - la figure 7 illustre l'inhibition de la tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline par la protéine rGrb14 : (O) GST-rGrb14 ; (●) GST-PIR de rGrb14 ; (□) GST-PIR+SH2 de rGrb14 ; (■) GST-SH2 de rGrb14

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue en l'absence de protéine ajoutée. Nombre d'expériences = 4

- 10 - la figure 8 illustre l'inhibition de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline par les différents domaines de mGrb10 : (O) GST-rGrb10 ; (○) GST-PIR de rGrb10 ; (□) GST-PIR+SH2 de rGrb10 ; (■) GST-SH2 de rGrb10

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue en l'absence de protéine ajoutée.

- 15 Nombre d'expériences = 2

Exemple 1 : Comparaison de l'effet des protéines rGrb14, mGrb10 et rGrb7 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

1. Mode opératoire:

- 20 Des récepteurs de l'insuline sont partiellement purifiés à partir de cellules CHO-IR, en passant un lysat cellulaire sur une colonne de lectine de germe de blé et en éluant les glycoprotéines retenues avec de la N-acétylglucosamine 0,3M. Les récepteurs de l'insuline ainsi purifiés sont incubés en présence d'insuline ($0 \text{ à } 10^{-7} \text{ M}$) pendant 1 heure à température ambiante. On ajoute alors un tampon contenant de
- 25 l'ATP 20 μM , des ions MnCl_2 et MgCl_2 et du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ ATP}$ pour permettre aux récepteurs de s'autophosphoryler, et des quantités croissantes des protéines Grbs purifiées exprimées en fusion avec la GST. 30 minutes après, on ajoute 15 μg d'un substrat de synthèse, le poly Glu-Tyr (4:1). L'activité tyrosine kinase des récepteurs est mesurée par l'incorporation de radioactivité dans le poly Glu-Tyr pendant 30 min.

- 30 **2. Résultats:**

Ils sont représentés par la figure 6.

- L'addition des protéines GST-Grb14 et GST-Grb10 induit une inhibition de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline. L'effet des deux protéines est similaire: une inhibition de 50% est obtenue en ajoutant 0,1 μg de
- 35 protéine, alors que l'ajout de 1 μg de protéine induit une inhibition maximale, de 90 à

100 %. Par contre la protéine GST-Grb7 n'exerce comparativement qu'un très faible effet inhibiteur (30%).

Exemple 2 : Effet inhibiteur des différents domaines de rGrb14 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

1. Mode opératoire:

Les récepteurs de l'insuline sont partiellement purifiés comme décrit dans l'exemple 1. Les différents domaines de rGrb14 (rGrb14, PIR, SH2, PIR-SH2, PIR-SH2 R464K) sont produits en fusion avec la GST et purifiés. L'effet inhibiteur de ces protéines sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est analysé comme décrit dans l'exemple 1.

2. Résultats:

Ils sont représentés à la figure 7.

le domaine PIR exerce un effet inhibiteur comparable à celui de la protéine rGrb14 entière, alors que le domaine SH2 n'a aucun effet (de même que la protéine délétée des régions PIR-SH2, résultats non montrés). Cependant, le domaine PIR-SH2 a un effet inhibiteur beaucoup plus important que le PIR seul ou la protéine entière (l'effet inhibiteur maximal est obtenu en ajoutant 0,03 µg de protéine). Cette potentialisation est supprimée par la mutation du résidu arginine 464 du motif FLVRES conservé qui inactive le domaine SH2, puisque le domaine PIR-SH2 R464K a le même effet que le PIR seul (résultats non montrés).

Ces résultats montrent que l'effet inhibiteur de rGrb14 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline est due à la présence du PIR. Le domaine SH2 seul n'a aucun effet, mais il potentialise l'effet du PIR.

Exemple 3 : Effet inhibiteur des différents domaines de Grb10 sur l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline

1. Mode opératoire:

Le mode opératoire est identique à celui décrit dans l'exemple 2.

2. Résultats:

Ils sont représentés à la figure 8.

Le domaine PIR exerce un effet inhibiteur, mais cet effet est légèrement moins fort que celui exercé par la protéine entière (la courbe dose-réponse est décalée vers la droite). Le domaine SH2 seul n'a pas d'action inhibitrice, mais il potentialise l'inhibition exercée par le PIR (la courbe dose-réponse du PIR-SH2 est

décalée vers la gauche).

Ces résultats montrent que la protéine Grb14 et les protéines adaptatrices homologues sont des inhibiteurs endogènes de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation de la protéine Grb14 et des protéines adaptatrices homologues, comme outil de criblage de molécules destinées au traitement des maladies liées à l'insuline.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les protéines contiennent une séquence choisie dans le groupe constitué par SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 5.
3. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine est choisie dans le groupe constitué par rGrb14,
10 hGrb14, hGrb10 et mGrb10.
4. Procédé de détection de molécules aptes à stimuler ou à inhiber les interactions de la protéine Grb14 ou des protéines adaptatrices homologues avec le récepteur de l'insuline, lequel procédé comprend :
 - la mise en contact de la molécule à tester avec ladite protéine dans des conditions
 - 15 permettant la formation d'une liaison entre cette molécule et ladite protéine, et
 - la détection du complexe éventuellement formé.
5. Procédé de détection selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine comprend au moins une séquence choisie dans le groupe constitué par SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 5.
- 20 6. Procédé de détection selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine comprend au moins une séquence choisie dans le groupe constitué par rGrb14, hGrb14, hGrb10 et mGrb10.
7. Utilisation d'une molécule apte à se fixer sur les protéines Grb10, Grb14 ou sur des protéines homologues adaptatrices pour la fabrication d'un
25 médicament utile dans le traitement du diabète et de l'obésité.

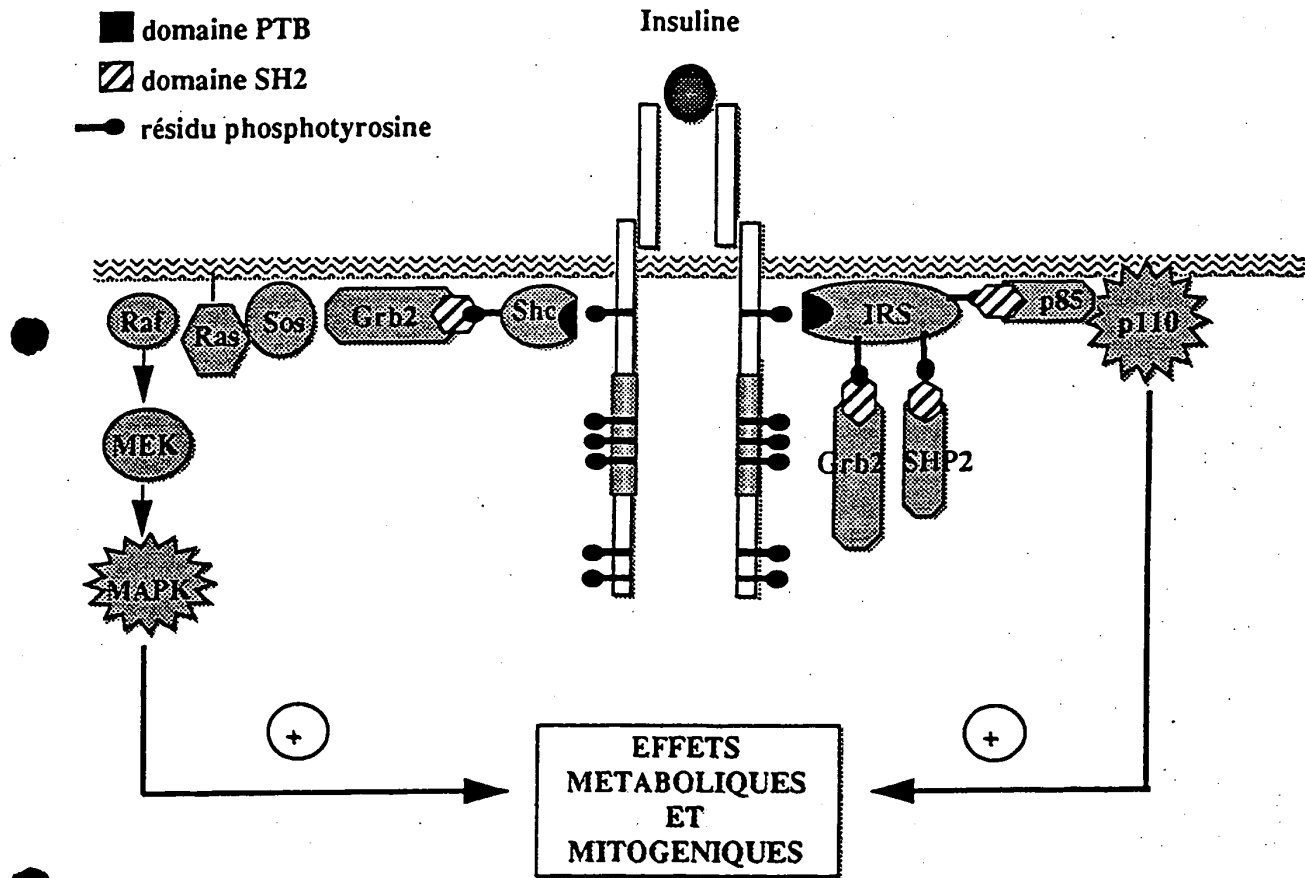


Figure 1:

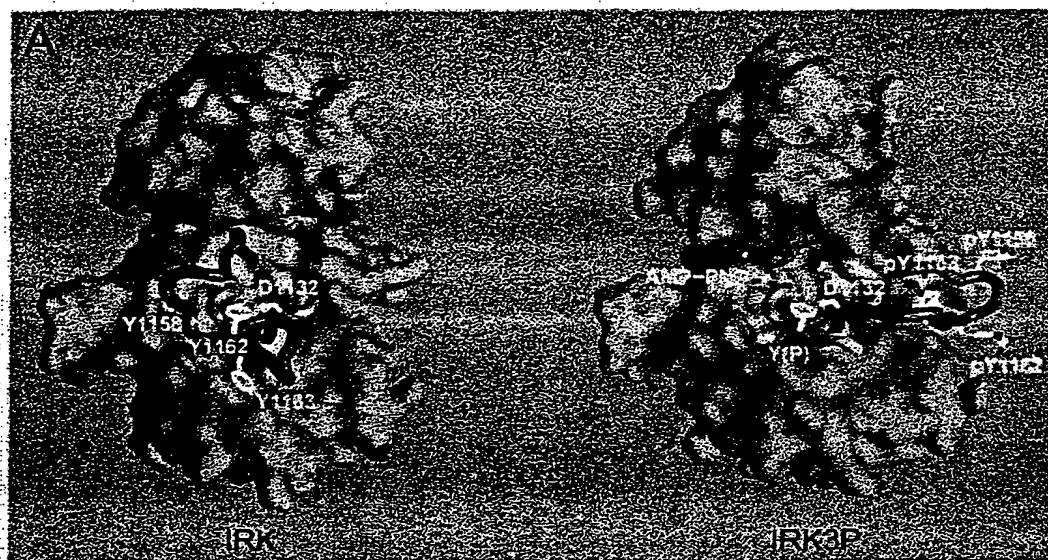


Figure 2:

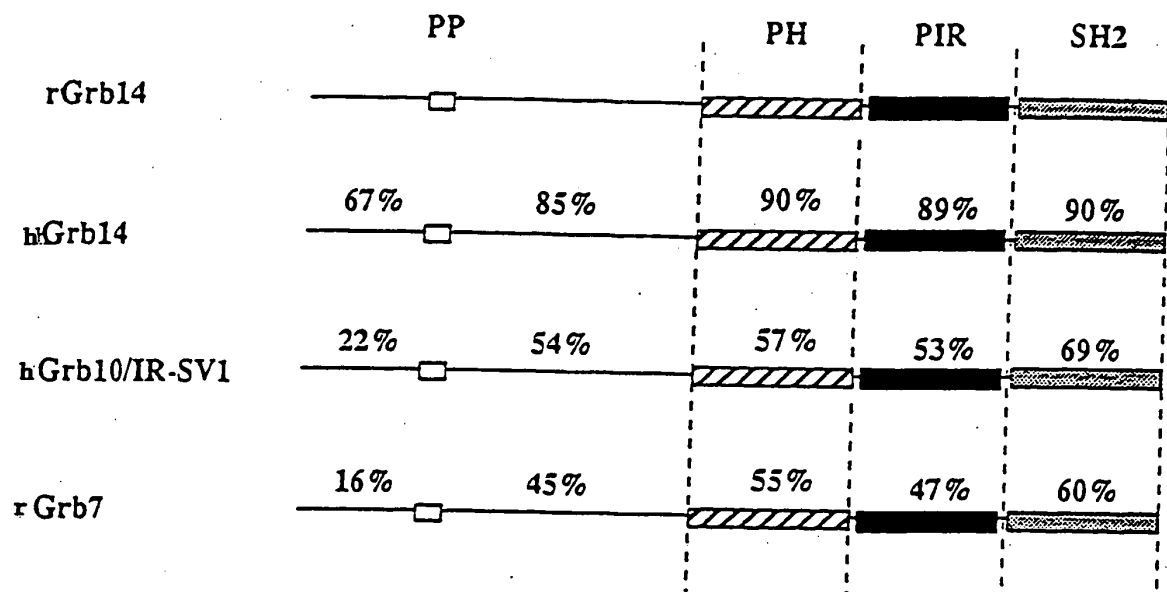


FIG. 3

SEQ ID N°1 rGrb14
 SEQ ID N°2 hGrb14
 SEQ ID N°4 hGrb10/IR-SV1
 rGrb7

353 QARSACSSQS-VSPHRSUSENLYANDFSGQTRVIONRTEALISVAZEGUAMRKKGCLRGLNIIGSPTAPSQSSAVNMALIRSQP
 355 QGRSGCSSQS-ISPMSISENSLAVANDFSGQKSRVTENPTFAISUNVEGUAMRKKGCLRGLGTIIGSPTASSQSSATNMALIRSQP
 353 QQRKALLSPF-STPVHSVBENSUANDFSGQGTGRVTENPAAQSNATVEGUAMRKK-STRMNILGS-QSPHIPSTLSTVIHRTQH
 354 -SRUILPSCIGSPPLRSAIDNTHVANDFSGHAGRVIENTPREATSVATEAQAHRKKNTNIRLSIPMP----ASGTSLSAAIHRTQL
 * * * * *

FIG. 4

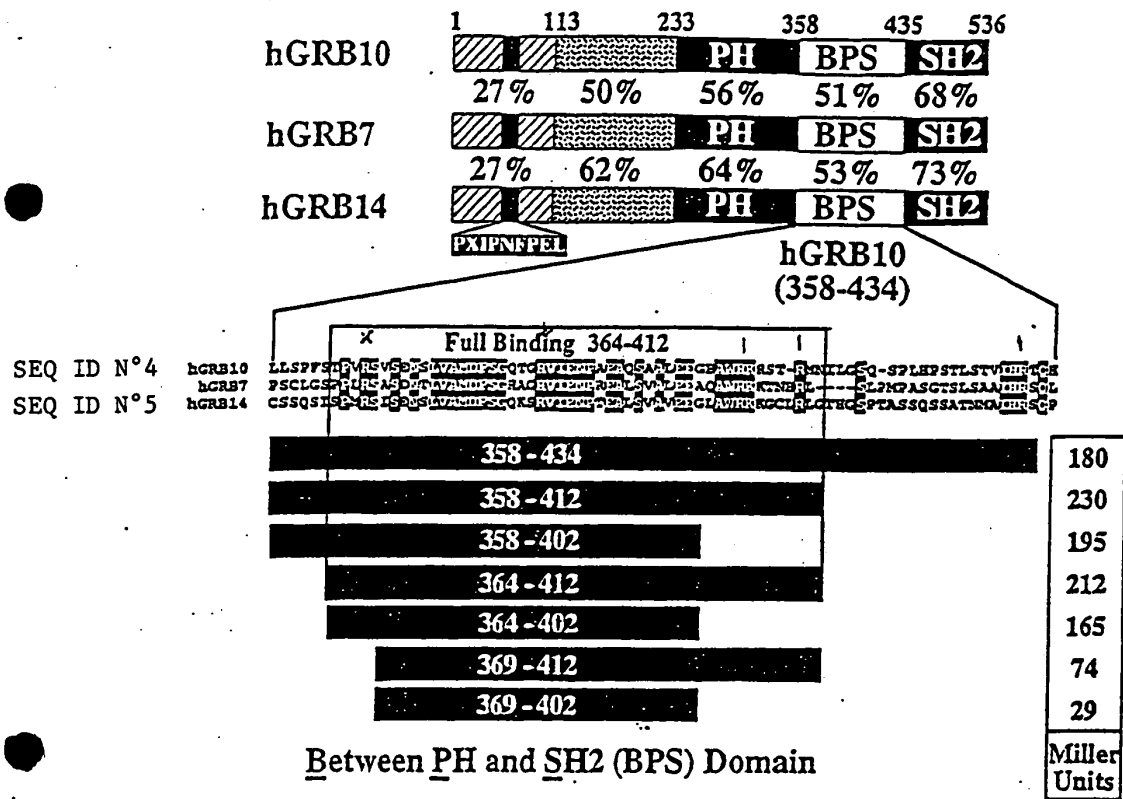


FIG. 5

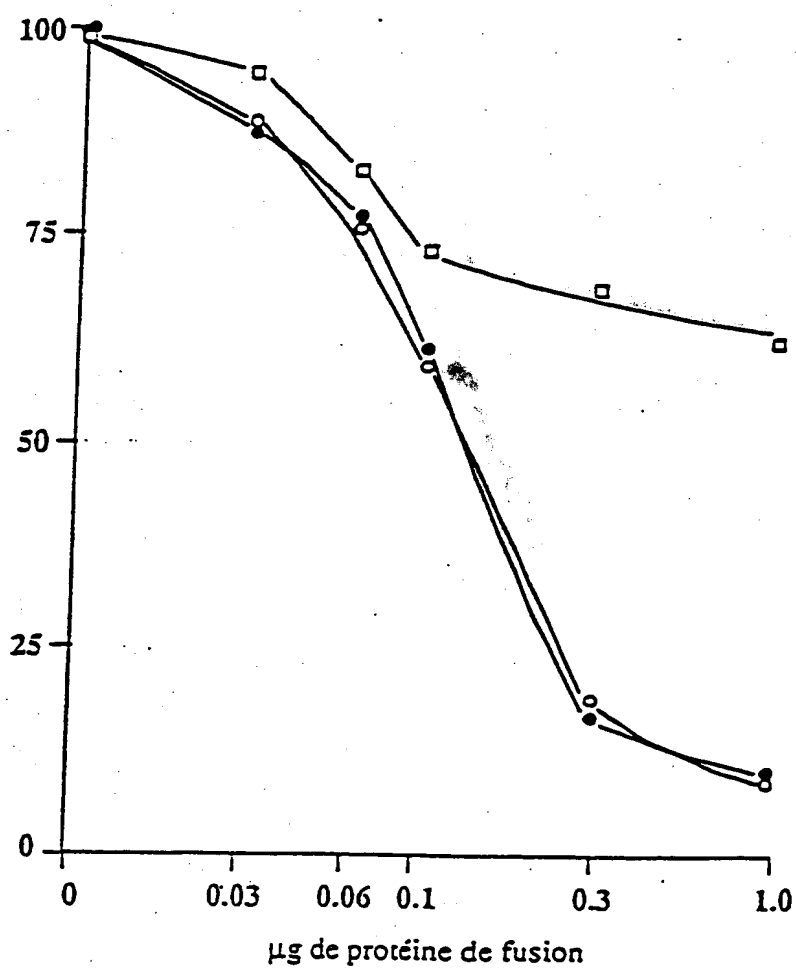


FIG. 6

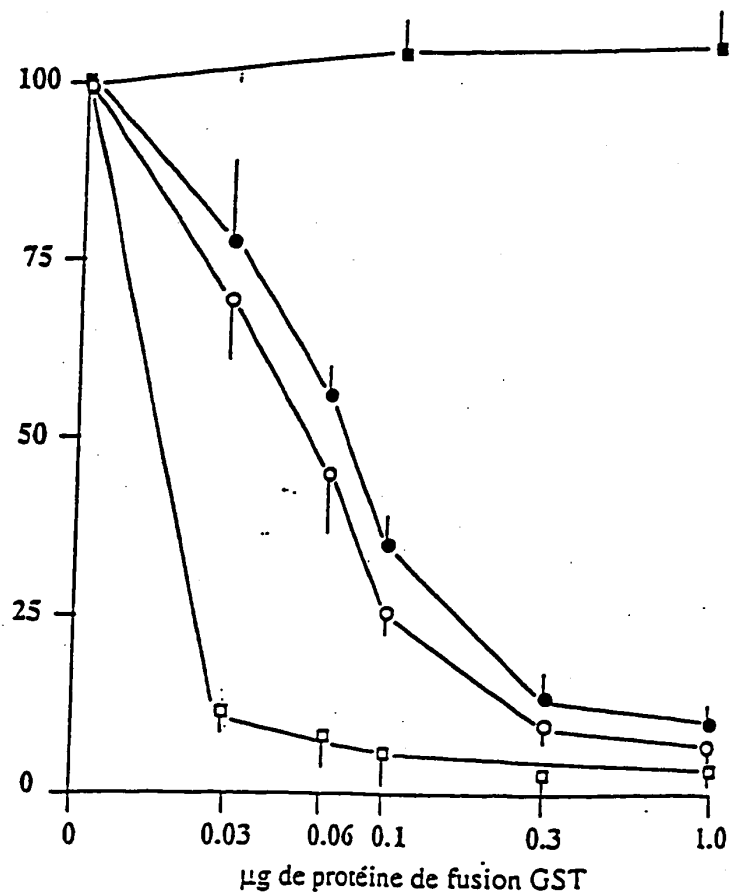


FIG. 7

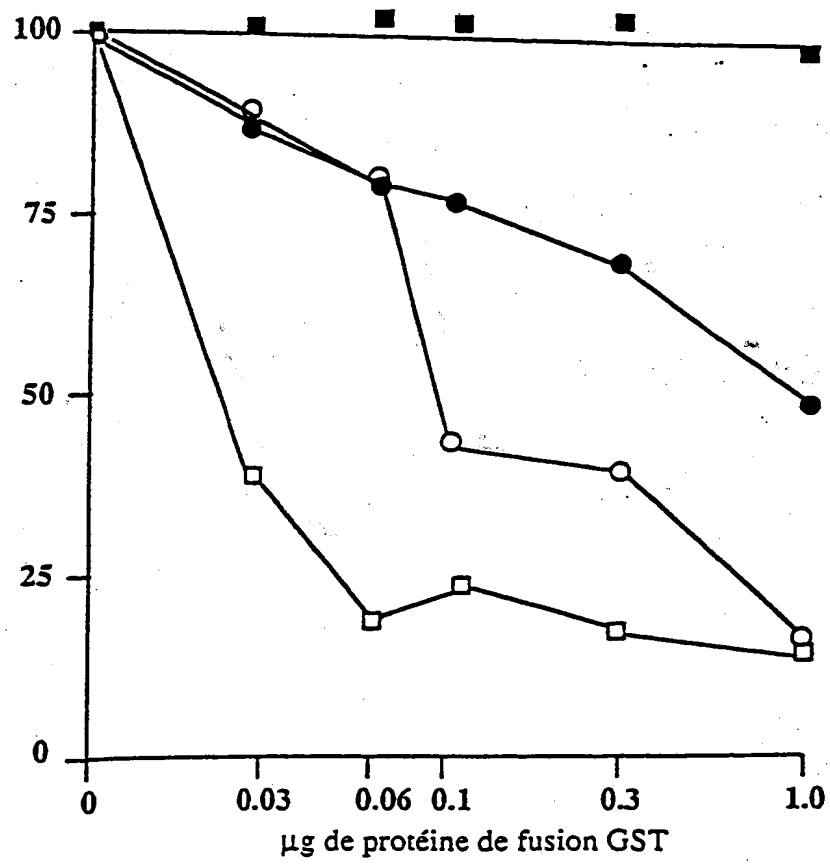


Figure 8: